

[p. 2]

## DESCRIPTION

Continuous culture production of a mixed lactic starter for direct addition in cheese-making.

**Technique Sector:**

Milk sector, cheese-making.

**Technique Status:**

Concentrated lactic starter production methods have developed in the last twenty years, their commercial launch taking place in the 1980s (DVS. Direct vat system. ICF. Inoculum pour cuve de fabrication) (Inoculum for manufacturing vat).

Starter culture industrial production is normally carried out via *batch fermentation* where the culture medium, usually with a whey or proteolysis milk base, is not renewed during fermentation, being removed at the end of the process alongside bacterial biomass. This system has an associated bacteriophage contamination risk during the required prior cultures as well as a considerable expense on cleaning, preparation and sterilisation time for equipment to be used in a new fermentation cycle.

Many have used a modification to the previous method, known as *fed-batch*, whose only difference is a continuous addition of nutrients to the culture medium during bacterial growth. In this way, limiting substrates in growth are avoided as well as the presence of substances in higher concentrations resulting inhibitory. This method allows notable increases to system productivity with regards to *batch* growth but it is subject to the same limitations.

At present, intense research is being carried out by large ferment manufacture industries with the aim of applying the production system of the aforementioned by continuous culture. Many have described micro-organism growth in continuous culture with cell recycling. In this system, cell culture continuously taken from the system is subject to microfiltration, with toxic metabolic products being eliminated in this way and biomass again being reincorporated into the system. The process productivity is evidently increased with regards to previous systems. However, this process may not be applied to ferment production, due to the fact that the biomass obtained shows less viability, greater incubation period after being added to the milk and a reduction in the latter's acidification rate.

Lastly, there is a variant to continuous culture which has been used experimentally in bacterial strain biomass production in a mixed way. This consists of the inclusion of preinoculum cells in a polymeric matrix (calcium alginate) with the aim of stabilising the proportion between strains during the fermentation process.

The system we propose is *continuous fermentation* allowing continuous biomass production during long periods of time, maintaining culture conditions constant. This system is rarely used industrially, perhaps because it requires complex equipment and

the contamination risks seem greater than in batch fermentation (Lloyd and Pont, 1973). However, the process used considerably improves productivity (viable cell biomass production) with respect to batch fermentation and it is much less laborious, avoiding daily cleaning and sterilisation cycles. Furthermore, the use of the modified BRFS culture (Bruno-Bárcena et al., 1998), a semi-defined low cost method, where glucose is substituted for lactose (the main sugar in milk), eliminating magnesium sulphate ( $\text{SO}_4\text{Mn}$ ) and adding sodium nitrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ ), allows the productivity:cost ratio to be increased, favouring later growth in ferment milk and allowing cells to be separated easily for later concentration.

#### **Invention Description:**

The invention patent pertaining to the present report refers to a new continuous culture production method of a mixed lactic starter, made up of the strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) and *Leuconostoc citreum* IPLA 616 (CECT 5182) to be used in dairy products.

[p. 3]

The increasing production of artisanal cheeses in Asturias carries with it the need to develop autochthonous lactic starters for those cheese varieties whose elaboration demands the use of pasteurised milk due to the normal consumption period being less than two months from maturation.

Amongst the Asturian cheeses, the acidic coagulation cheese *Afuega'l Pitu* should be noted, its annual production exceeding 200,000 kg. This cheese has been characterised from a microbiologic and physiochemical viewpoint. A large number of lactic strains, belonging to the *Lactococcus* and *Leuconostoc* types, were taken from cheeses made with raw milk. These strains were put through different tests (acidification capacity, proteolytic activity, aromatic substance production, compatibility, sensitivity/resistance to bacteriophage, antibiotics, detergents and disinfectants). Results from the different trials allowed those strains whose metabolic characteristics were most appropriate to provide taste and aroma fitting for this cheese variety to be selected.

Different mixes and strain proportions were trialled to make the *Afuega'l Pitu* cheese with pasteurised milk, the most appropriate being that formed from the *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) and *Leuconostoc citreum* IPLA 616 (CECT 5182) strains. Cheese diary milk is 1% (v/v) inoculated with a milk culture mix (16 hours at 30°C) for each strain. In this mix, the indicated strains are present in a proportion of 3:1:1:3 (v/v) respectively.

#### **Detailed Invention Description:**

The designed *liquid ferment* for this cheese showed itself to work perfectly in the different manufacture trials carried out, both in the pilot plant for the *Instituto de Productos Lácteos de Asturias* (Asturian Institute of Dairy Products) as in artisanal cheese diaries. However, its use requires daily propagation with the consequent contamination risk, thus conditioning its habitual use for artisanal cheeses. To resolve

this problem, we decided to produce this autochthonous ferment in the form of a *lyophilized concentrate for direct vat addition*. This format does not require complex manipulations nor special transport or storage conditions. Furthermore, the direct addition technique has the advantage of allowing complex specimen mixes to be added and/or different strains in determined proportions, this being the concrete case for our ferment.

All trials were carried out in a BIORSTAT B fermentor (Braun – Biotech International GmbH) (Figure 1) with a 2 litre capacity fermentation vat, using a working volume of 750 ml. The fermentor has a turbine stirrer system (Rushton model) and a Pt-100 temperature probe. The pH and pO<sub>2</sub> probes, both bearing the Ingold brand, are extractable. The physiochemical parameters the aforementioned instruments make reference to are monitored and subjected to control in a base unit or control unit. It is also equipped with four peristaltic pumps regulating acid or alkali addition (as per pH control requirements), with fresh culture from a sterile reservoir and a final one which allows constant work volume to be maintained. It also allows the O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> flow to be regulated from 0 to 10 l/min. in this way controlling the aerobic and anaerobic culture conditions.

Continuous culture condition variations are determined by the fresh culture addition flow to the fermentation vat. The quotient between this flow and the fermentor work volume is defined as *Dilution Rate (D)*. Successive rises to this parameter increase system productivity to a maximum, whilst progressively reducing cell resistance to freezing. This implies a need to reach a compromise between both effects with the aim of maximising net system biomass productivity (Figure 2).

Fermentor work load is maintained constant via continual functioning of a peristaltic pump connected to an air intake tube introduced to the fermentation vat until the preset culture medium level is reached. Extracted cell culture is stored in a sterile refrigerated reservoir (4°C) until a preset volume is reached ( $\geq 10$  litres). Culture concentration is then carried out via a tangential flow filtration unit (Cole-Parmer Instrument Company) comprising three 0.3  $\mu$ m pore sized superimposed membranes (Omega Open Channel, Minisette Membrane Cassettes, Pall Filtron Corporation). Recirculation flow is maintained around 3.0 l/min. achieving an initial residual mean elimination flow free from cells of approximately 500 ml/min. This flow progressively reduces as the culture is concentrated, the system concentration limit being factor x5.

[p. 4]

Subsequently, the concentrated culture is subjected to centrifugation (10,000 r.p.m., 5 min.); cell sediment is cleaned twice with an isotonic saline solution and resuspended in skimmed milk reconstituted at 11% (p/v) and supplemented with the optimum cryoprotector concentration (8% v/v sucrose). Finally, it is frozen at -80°C for later lyophilization. After these processes, the biomass obtained is in optimum conditions for use as direct vat ferment addition.

Ferment strain stock is maintained frozen (-80°C) in the aforementioned conditions.

In every trial, the inoculum was prepared from a frozen strain, two successive cultures being carried out (at 30°C for 16 hours) in supplemented fermentation with

$\beta$ -glycerolphosphate (19 g/l) (buffer effect). The inoculum percentage (v/v) used was 2% in all cases.

Before starting continuous culture trials, the implication of various fermentation parameters (pH,  $pO_2$  and carbon source concentration) on the growth rate, biomass production and metabolic balance of each strain via batch culture was determined. The temperature used in all trials was 30°C and stirring at 150 r.p.m. Aerobic or anaerobic conditions ( $pO_2$ ) were maintained by connecting an air generator pump or  $N_2$  bottle to the equipment air/gas entry system. pH control was carried out via adding  $NH_3$  at 20%.

The aforementioned fermentation parameter values trialled were: pH (6.5, 6.0 and 5.5);  $pO_2$  (free  $O_2$ , 20%  $O_2$ , 0%  $O_2$ ); lactose concentration (0.5, 1.0, 1.5 and 2%).

Although the pH variation within the studied range did not have a substantial effect on final attained growth in the three strains, pH 6.5 was chosen for later continuous culture trials as it produced a slight increase in the *growth rate* ( $\mu$ ) of the three strains. However, the oxygen concentration variation of the method had a more pronounced effect. This is question of three aerotolerant anaerobic micro-organisms for which oxygen is toxic but have systems to eliminate it from the method. In the case of the two lactococci with homofermentative metabolism, growth was favoured when oxygen was completely removed from the culture medium immediately before inoculation, greater growth rates being reached than where oxygen was present, although final obtained biomass was the same. Maintenance of a forced oxygen atmosphere (20%) drastically reduced the growth rate and biomass obtained in both strains although more noticeably in *Lc. lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180). This latter effect did not take place in the case of heterofermentative *Ln. citreum* IPLA 616 (CECT 5182) which, although experiencing favourable growth via anaerobic conditions, did see a greater increase in its growth rate under forced oxygen atmosphere, a classic effect already seen for heterofermentative micro-organisms.

Contrarily, the total amount of viable cells obtained at the end of the growth of the three strains was independent of the carbon source concentration (lactose) present in the culture medium, thus the lower concentration (0.5%) was selected for continuous fermentation trials.

The optimum batch culture growth conditions were applied to continuous culture of strains. In this culture system, and in steady state, the growth rate coincides with the dilution rate applied to the culture. For strain *Lc. lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180), the calculated optimum dilution rate so as to maximise biomass production was  $D=0.76\text{ h}^{-1}$ , allowing this system a 10-fold increase in daily cell productivity with regards to batch culture. In the case of *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181), the optimum dilution rate was  $D=0.57\text{ h}^{-1}$ , allowing for a daily productivity 4 times higher than the batch culture to be achieved. For strain *Ln. citreum* IPLA 616 (CECT 5182), daily productivity increased 5-fold applying the optimum dilution rate of  $0.57\text{ h}^{-1}$ .

As well as optimising biomass production by time unit for each strain (*gross productivity*), in order to calculate the *net productivity* of the system, cell viability after lyophilization has been taken into account.

The critical lyophilization point corresponds to the freezing phase. With the aim of minimising it, the cryoprotector effect of different substances was studied bearing in mind two factors: viability and speed of cell activity recovery. Recovery speed shall be greater the lesser the culture incubation phase duration. The sucrose used at 8% (v/v) final concentration in milk was the chosen cryoprotector as it provided a recovery viability and activity 1.2 and 1.15 times, respectively, more than that obtained when freezing was carried out with non-supplemented milk.

[p. 5]

In order to obtain milk behaviour comparable to that shown by the liquid ferment, the lyophilized strains must be inoculated in the cheese dairy milk as per the following concentration:  $1.2 \times 10^7$  ufc/ml [*Lc. lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180)],  $4 \times 10^6$  ufc/ml [*Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181)], and  $4.9 \times 10^6$  [*Ln. citreum* IPLA 616 (CECT 5182)].

The greater continuous culture system efficiency over batch culture for viable cell production is seen in comparing the results obtained for the three mixed ferment strains set out in tables 1 and 2.

TABLE 1  
Batch Culture †

Strain	$\mu$	Ufc/ml (viable)	G.P.	N.P.	Inoculum (Ufc/ml)	Daily Processed Milk (1)
947	0.44	$1 \times 10^9$	$7.5 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^7$	27.5
838	0.59	$3 \times 10^9$	$2.2 \times 10^{12}$	$9.9 \times 10^{11}$	$4 \times 10^6$	247.5
616	1.17	$7 \times 10^9$	$5.2 \times 10^{12}$	$2.3 \times 10^{12}$	$4.9 \times 10^6$	469.4

TABLE 2  
Continuous Culture ‡

Strain	$\mu$	Ufc/ml (viable)	G.P.	N.P.	Inoculum (Ufc/ml)	Daily Processed Milk (1)
947	0.76	$1 \times 10^9$	$1.38 \times 10^{13}$	$2.76 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^7$	230
838	0.57	$2.2 \times 10^9$	$2.2 \times 10^{13}$	$4.4 \times 10^{12}$	$4 \times 10^6$	1100
616	0.57	$5.5 \times 10^9$	$5.7 \times 10^{13}$	$1.14 \times 10^{12}$	$4.9 \times 10^6$	2326

† Survival rate in batch culture after lyophilization = 0.45

‡ Survival rate in continuous culture after lyophilization = 0.20

$\mu$  = Growth rate

G.P. = Gross productivity (Number of cells produced in 24 hours)

N.P. = Net productivity (Net productivity x Survival rate)

Inoculum = Optimum cell concentration (Ufc/ml) in cheese dairy vat milk

Daily processed milk = Number of litres of milk that could be made into cheese daily using the optimum inoculum for each ferment strain.

[p. 6]

## CLAIMS

1. Production method for continuous culture of a mixed lactic starter for direct addition in the elaboration of cheese consisting of the use of a fermentor with addition via constant flow culture and simultaneous cell culture extraction.
2. Production method for continuous culture of a mixed lactic starter for direct addition in the elaboration of cheese, as per claim 1, **characterised** by the use of a semi-defined low cost method, a small work volume (750 ml) and a cell concentration method via tangential filtration (0.3  $\mu\text{m}$  pore size) followed by centrifugation (10,000 r.p.m. 5 min).
3. Production method for continuous culture of a mixed lactic starter for direct addition in the elaboration of cheese, as per claims 1 and 2, **characterised** by the following optimum fermentation parameters: Temperature: 30°C; Stirring: 150 r.p.m; pH 6.5 and anaerobic conditions.
4. Production method for continuous culture of a mixed lactic starter for direct addition in the elaboration of cheese, as per claims 1 and 2, **characterised**, as the system productivity is determined by the culture medium addition flow.
5. Production method for continuous culture of a mixed lactic starter for direct addition in the elaboration of cheese, as per claims 1 and 2, **characterised** by the use of concentrated cell suspension consisting of skimmed milk reconstituted at 11% (p/v) and supplemented with sucrose at 8% (v/v) as a cryoprotector agent, increasing the survival rate after the lyophilization process.
6. Production method for continuous culture of a mixed lactic starter for direct addition in the elaboration of cheese, as per claims 1 and 2, **characterised** as the use of a low cost culture whose composition is: lactose: 0.5%; yeast extract: 1%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.005%;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ : 0.25%;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.2%, allows the system productivity/cost relation to be increased.
7. Production method as per claims 1 and 2 **characterised** by the use of the strains: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180); *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) and *Leuconostoc citreum* IPLA 616 (CECT 5182).



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 158 800**  
⑯ Número de solicitud: **009901980**  
⑮ Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 9/00**  
A23C 19/00

⑫

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑯ Fecha de presentación: <b>03.09.1999</b>	⑪ Solicitante/s: <b>Consejo Superior de Investigaciones Científicas Serrano, 117 28006 Madrid, ES</b>
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: <b>01.09.2001</b>	⑫ Inventor/es: <b>Rodríguez González, Ana; Cárcoba Ruiz, Roberto y Cuesta Alonso, Emilia Paloma</b>
⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: <b>01.09.2001</b>	⑭ Agente: <b>No consta</b>

⑯ Título: **Producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso.**

⑯ Resumen:

Producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso.

El sistema consiste en un fermentador equipado con una cuba de fermentación, utilizada con 750 ml de medio de cultivo como volumen de trabajo. La adición de medio de cultivo estéril se lleva a cabo a un flujo constante mediante una bomba peristáltica conectada a un reservorio. El medio de cultivo empleado es un medio semidefinido de bajo coste cuya composición es: lactosa, 0.5%; extracto de levadura, 1%; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25%; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2%.

ES 2 158 800 A1

## DESCRIPCION

Producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso.

## 5 Sector de la técnica:

Sector láctico, elaboración de quesos.

## 10 Estado de la técnica:

Los procedimientos de producción de fermentos lácticos concentrados se han desarrollado en los últimos veinte años, teniendo lugar el lanzamiento comercial de los mismos en los años ochenta (DVS, direct vat system; ICF, Inoculum pour cuve de fabrication).

15 Habitualmente la producción industrial de cultivos iniciadores se realiza mediante *fermentación en batch* en la que el medio de cultivo, usualmente con base de suero lácteo o leche proteolizada, no es renovado durante la fermentación, siendo vaciado al final del proceso junto con la biomasa bacteriana. Este sistema lleva asociado riesgo de contaminación por bacteriófagos durante los cultivos previos que requiere, así como un considerable gasto de tiempo en limpieza, preparación y esterilización del material 20 para su utilización en un nuevo ciclo de fermentación.

Diversos autores han utilizado una modificación del método anterior, denominado *fed-batch*, que difiere únicamente en que existe un aporte continuo de nutrientes al medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano. Se consigue de este modo evitar que los sustratos sean limitantes para el crecimiento, así 25 como la presencia de sustancias en concentraciones elevadas que resultarían inhibitorias. Este método permite incrementos notables en la productividad del sistema respecto al crecimiento en *batch* pero está sujeto a las mismas limitaciones.

30 En la actualidad, se está realizando una intensa investigación por parte de las grandes industrias productoras de fermentos, con objeto de aplicar el sistema de producción de los anteriores por cultivo continuo. Varios autores han descrito el crecimiento de microorganismos en cultivo continuo con reciclaje celular. En este sistema el cultivo celular retirado del sistema de manera continua es sometido a microfiltración, eliminándose de esta manera los productos metabólicos tóxicos y reincorporando la biomasa de nuevo al sistema. La productividad del proceso se vea incrementada ostensiblemente respecto a sistemas 35 anteriores. Sin embargo, este procedimiento no puede ser aplicado a la producción de fermentos, debido a que la biomasa obtenida presenta una menor viabilidad, un tiempo de latencia mayor tras ser añadida a la leche y una reducción en la velocidad de acidificación de la misma.

40 Por último señalar una variante del cultivo continuo que ha sido aplicada de manera experimental para la producción de biomasa de cepas bacterianas de manera mixta. Consiste en la inclusión de las células del preinóculo en una matriz polimérica (alginato cálcico) con objeto de estabilizar la proporción entre cepas durante el curso de la fermentación.

45 El sistema que proponemos es el de *fermentación continua* que permite la producción de biomasa de manera continua durante extensos períodos de tiempo, manteniendo constantes las condiciones del cultivo. Este sistema es poco utilizado industrialmente, quizás porque requiere equipos complejos, y los riesgos de contaminación parecen ser mayores que en la fermentación en *batch* (Lloyd y Pont, 1973). Sin embargo, el procedimiento utilizado mejora considerablemente la productividad (producción de biomasa celular viable) con respecto a la fermentación en *batch*, y es mucho menos laborioso, pues evita los 50 ciclos diarios de limpieza y esterilización. Además, la utilización del medio de cultivo BRFS modificado (Bruno-Bárcena *et al.*, 1998), un medio semidefinido de bajo coste, en el que hemos sustituido la glucosa por lactosa (azúcar mayoritaria en la leche), eliminado el sulfato de manganeso ( $SO_4Mn$ ), y añadido 55 citato sódico ( $Na_4C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ), permite incrementar la relación productividad / coste, favorece el posterior crecimiento en leche del fermento y permite separar las células con facilidad para su posterior concentración.

## Descripción de la invención:

60 La patente de invención objeto de la presente memoria se refiere a un nuevo método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto, constituido por las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) y *Lactococcus citreum* IPLA 618 (CECT 5182), para ser utilizado en quesería.

La creciente producción de quesos artesanales en Asturias conlleva la necesidad de desarrollar fermentos lácticos autóctonos para aquellas variedades de queso cuya elaboración exige la utilización de leche pasteurizada al ser el período habitual de consumo inferior a los dos meses de maduración.

5 Entre los quesos elaborados en Asturias cabe destacar el *Afuega'l Pitu*, queso de coagulación ácida, cuya producción anual supera los 200.000 kg. Este queso ha sido caracterizado bajo un punto de vista microbiológico y fisicoquímico. Un elevado número de cepas lácticas, pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* fueron aisladas a partir de quesos elaborados con leche cruda. Dichas cepas fueron  
10 sometidas a diferentes tests (capacidad de acidificación, actividad proteolítica, producción de sustancias aromáticas, compatibilidad, sensibilidad/resistencia a bacteriófagos, antibióticos, detergentes y desinfectantes). Los resultados de las diferentes pruebas permitieron seleccionar las cepas cuyas características metabólicas eran las más adecuadas para proporcionar el sabor y aroma propios de esta variedad de queso.

15 Se ensayaron diferentes mezclas y proporciones de cepas para elaborar el queso *Afuega'l Pitu* con leche pasteurizada, resultando la más adecuada la formada por las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) y *Leuconostoc citreum* IPLA 616 (CECT 5182). La leche de quesería es inoculada al 1% (v/v) con una mezcla de cultivos  
20 en leche (16 h a 30°C) de cada una de las cepas. En dicha mezcla, las cepas indicadas están presentes en la proporción 3:1:1.3 (v/v), respectivamente.

#### Descripción detallada de la invención:

25 El fermento líquido diseñado para este queso muestra un perfecto funcionamiento en los diferentes ensayos de fabricación realizados, tanto en la planta piloto del Instituto de Productos Lácteos de Asturias como en queserías artesanales. Sin embargo, la utilización del mismo requiere la propagación diaria, con el consiguiente riesgo de contaminación, lo cual condiciona su uso habitual por los queseros artesanos. Para solventar este problema, decidimos producir este fermento autóctono en forma de *concentrado liofilizado de adición directa a cuba*. Este formato no requiere manipulaciones complejas ni condiciones especiales de transporte o almacenamiento. Además, la técnica de adición directa tiene la ventaja adicional de permitir añadir mezclas complejas de especies y/o cepas diferentes en proporciones determinadas, siendo éste el caso concreto de nuestro fermento.

35 Todos los ensayos se realizaron en un fermentador BIOSTAT B (Braun - Biotech International GmbH) (Figura 1) con cuba de fermentación de 2 litros de capacidad, utilizando un volumen de trabajo de 750 ml. El fermentador dispone de un sistema de agitación de turbina (modelo Rushton) y una sonda de temperatura modelo Pt-100. Las sondas de pH y pO<sub>2</sub>, ambas de marca Ingold, son extraíbles. Los parámetros físico-químicos a los que hacen referencia los instrumentos descritos, son monitorizados y  
40 sometidos a control en una unidad base o unidad de control. Está equipada asimismo con cuatro bombas peristálticas que regulan la adición de ácido o álcali (según los requerimientos para el control del pH), de medio de cultivo fresco desde un reservorio estéril, y una última que permite mantener constante el volumen de trabajo. Permite asimismo regular el flujo de O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, desde 0 a 10 l/min, controlando de esta manera las condiciones aerobias o anaerobias del cultivo.

45 La variación en las condiciones del cultivo continuo está determinada por el flujo de adición de medio de cultivo fresco a la cuba de fermentación. Se define como *Tasa de Dilución (D)* al cociente entre este flujo y el volumen de trabajo del fermentador. Incrementos sucesivos en este parámetro aumentan la productividad del sistema hasta un máximo, reduciendo sin embargo de manera progresiva, la resistencia de las células a la congelación. Esto implica la necesidad de alcanzar un compromiso entre ambos efectos, con objeto de maximizar la productividad neta de biomasa del sistema (Figura 2).

55 El volumen de trabajo del fermentador se mantiene constante mediante el funcionamiento ininterrumpido de una bomba peristáltica conectada a un tubo de aspiración introducido en la cuba de fermentación hasta alcanzar el nivel prefijado del medio de cultivo. El cultivo celular retirado es almacenado en un reservorio estéril refrigerado (4°C), hasta que se alcanza un volumen predeterminado ( $\geq 10$  litros). Se procede entonces a la concentración del cultivo mediante una unidad de filtración de flujo tangencial (Cole-Parmer Instrument Company) compuesta por tres membranas superpuestas de 0.3  $\mu$ m de tamaño de poro (Omega Open Channel, Minisette Membrane Cassettes, Pall Filtron Corporation). El flujo de  
60 recirculación se mantiene en torno a 3.0 l/min, consiguiéndose inicialmente un flujo de eliminación de medio residual libre de células de aprox. 500 ml/min. Este flujo desciende progresivamente a medida que el cultivo es concentrado, siendo el límite de concentración del sistema de un factor x5. Posteriormente,

el cultivo concentrado se somete a centrifugación (10.000 r.p.m., 5 min); el sedimento celular se lava dos veces con solución salina isotónica y se resuspende en leche desnatada reconstituida al 11% (p/v) y suplementada con la concentración óptima de crioprotector (8% v/v de sacarosa). Finalmente, se congela a -80°C para su posterior liofilización. Tras estos procesos, la biomasa obtenida se halla en condiciones óptimas para su utilización como fermento de adición directa a cuba.

El stock de cepas del fermento se conservan congeladas (-80°C) en las condiciones antes indicadas.

En cada ensayo, el inóculo se preparó a partir de la cepa congelada, realizando dos cultivos sucesivos (a 30°C durante 16 horas) en el medio de fermentación suplementado con  $\beta$ -glicerolfosfato (19 g/l) (efecto tampón). El porcentaje de inóculo (v/v) utilizado fue del 2% en todos los casos.

Antes de iniciar los ensayos de cultivo continuo, se determinó la implicación de varios parámetros de fermentación (pH,  $pO_2$  y concentración de la fuente de carbono) sobre la tasa de crecimiento, la producción de biomasa y el balance metabólico de cada cepa mediante cultivo en batch. La temperatura utilizada en todos los ensayos fue de 30°C y la agitación de 150 r.p.m. Las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis ( $pO_2$ ) se mantuvieron conectando al sistema de entrada de aire/gas del equipo una bomba generadora de aire o una botella de  $N_2$ . El control de pH se realizó mediante la adición de  $NH_3$  al 20%.

Los valores de los parámetros de fermentación antes mencionados que se ensayaron fueron: pH (6.5, 6.0 y 5.5);  $pO_2$  ( $O_2$  libre, 20% de  $O_2$ ; 0%  $O_2$ ); concentración de lactosa (0.5, 1.0, 1.5 y 2%).

Aunque la variación del pH dentro del rango estudiado no ejerció un efecto sustancial sobre el crecimiento final alcanzado en las tres cepas, se eligió el pH 6.5 para posteriores ensayos de cultivo continuo porque producía un ligero incremento en la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de las tres cepas. Sin embargo, la variación de la concentración de oxígeno del medio tuvo un efecto más pronunciado. Se trata de tres microorganismos anaerobios aerotolerantes, para los que el oxígeno resulta tóxico, pero que cuentan con sistemas para eliminarlo del medio. En el caso de los dos lactococos, con metabolismo homofermentativo, el crecimiento resultó favorecido cuando el oxígeno era retirado totalmente del medio de cultivo inmediatamente antes de la inoculación, alcanzándose tasas de crecimiento más elevadas que en presencia de oxígeno, aunque la biomasa final obtenida fue la misma. El mantenimiento de una atmósfera forzada de oxígeno (20%) redujo drásticamente la tasa de crecimiento y la biomasa final obtenida en ambas cepas aunque de manera más pronunciada en el *Lc. lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180). Este último efecto no tuvo lugar en el caso del *Ln. citreum* IPLA 616 (CECT 5182), de metabolismo heterofermentativo, que si bien vela favorecido su crecimiento por condiciones de anaerobiosis, experimentaba un incremento aún mayor en su tasa de crecimiento bajo atmósfera forzada de oxígeno, efecto clásico ya descrito para microorganismos heterofermentativos.

Por otro lado, la cantidad total de células viables obtenidas al final del crecimiento de las tres cepas, resultó ser independiente de la concentración de fuente de carbono (lactosa) presente en el medio de cultivo, por lo que se seleccionó la menor concentración (0.5%) para los ensayos de fermentación continua.

Las condiciones óptimas de crecimiento determinadas en cultivo en batch se aplicaron al cultivo continuo de las cepas. En este sistema de cultivo, y en condiciones de estado estacionario (*steady state*), la tasa de crecimiento coincide con la tasa de dilución aplicada al cultivo. Para la cepa *Lc. lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180) la tasa de dilución óptima calculada para maximizar la producción de biomasa fue  $D=0.76\text{ h}^{-1}$ , permitiendo este sistema un aumento de 10 veces en la productividad celular diaria respecto al cultivo en batch. En el caso de *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) la tasa de dilución óptima fue  $D=0.57\text{ h}^{-1}$ , permitiendo alcanzar una productividad diaria 4 veces superior a la del cultivo en batch. Para la cepa *Ln. citreum* IPLA 616 (CECT 5182) la productividad diaria se incrementó 5 veces aplicando la tasa de dilución óptima de  $0.57\text{ h}^{-1}$ .

Además de optimizar la producción de biomasa por unidad de tiempo para cada cepa (*productividad neta*), se ha tenido en cuenta para calcular la *productividad neta* del sistema, la viabilidad celular tras el proceso de liofilización.

El punto crítico de la liofilización corresponde a la fase de congelación. Con objeto de minimizarlo se estudió el efecto crioprotector de diversas sustancias teniendo en cuenta dos factores: viabilidad y velocidad de recuperación de la actividad celular. La velocidad de recuperación será mayor cuanto menor es la duración de la fase de latencia del cultivo. La sacarosa utilizada a una concentración final de 8% (v/v) en leche fue el crioprotector elegido, pues confería una viabilidad y una actividad de recuperación 1.2 y 1.15 veces superior, respectivamente, a la obtenida cuando la congelación se realizaba en leche no

# ES 2158 800 A1

suplementada.

Para obtener un comportamiento en leche comparable al mostrado por el fermento líquido, las cepas liofilizadas deben ser inoculadas en la leche de quesería en la siguiente concentración:  $1.2 \times 10^7$  ufc/ml [*Lc. lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180)],  $4 \times 10^6$  ufc/ml [*Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181)] y  $4.9 \times 10^6$  ufc/ml [*Ln. citreum* IPLA 616 (CECT 5182)].

La mayor eficacia del sistema de cultivo continuo sobre el cultivo en batch para la producción de células viables, queda reflejada en la comparación de resultados obtenidos para las tres cepas del fermento mixto que se recogen en las tablas 1 y 2.

TABLA 1  
*Cultivo en batch* †

Cepa	$\mu$	Ufc/ml (viables)	P.B.	P.N.	Inóculo (Ufc/ml)	Leche procesada diariamente (l)
947	0.44	$1 \times 10^9$	$7.5 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^7$	27.5
838	0.59	$3 \times 10^9$	$2.2 \times 10^{12}$	$9.9 \times 10^{11}$	$4 \times 10^6$	247.5
616	1.17	$7 \times 10^9$	$5.2 \times 10^{12}$	$2.3 \times 10^{12}$	$4.9 \times 10^6$	469.4

TABLA 2  
*Cultivo continuo* ‡

Cepa	$\mu$	Ufc/ml (viables)	P.B.	P.N.	Inóculo (Ufc/ml)	Leche procesada diariamente (l)
947	0.76	$1 \times 10^9$	$1.38 \times 10^{13}$	$2.76 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^7$	230
838	0.57	$2.2 \times 10^9$	$2.2 \times 10^{13}$	$4.4 \times 10^{12}$	$4 \times 10^6$	1100
616	0.57	$5.5 \times 10^9$	$5.7 \times 10^{13}$	$1.14 \times 10^{12}$	$4.9 \times 10^6$	2326

†Tasa de supervivencia en cultivo en batch tras liofilización = 0.45

‡Tasa de supervivencia en cultivo continuo tras liofilización = 0.20

$\mu$  = Tasa de crecimiento

P. B. = Productividad bruta (Número de células producidas en 24 horas)

P.N. = Productividad neta (Productividad bruta x Tasa de supervivencia)

Inóculo = Concentración óptima de células (Ufc/ml) en la leche de la cuba de quesería Leche procesada diariamente = Número de litros de leche que podrían transformarse en queso diariamente utilizando el inóculo óptimo para cada cepa del fermento.

55

60

## REIVINDICACIONES

1. Método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso, consistente en la utilización de un fermentador con adición de medio de cultivo a flujo constante y extracción simultánea de cultivo celular.  
5
2. Método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso, según reivindicación 1, **caracterizado** por la utilización de un medio semidefinido de bajo coste, un pequeño volumen de trabajo (750 ml) y un método de concentración celular por filtración tangencial (0.3  $\mu$ m tamaño de poro) seguido de centrifugación (10.000 r.p.m 5 min).  
10
3. Método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso, según reivindicación 1 y 2, **caracterizado** por los siguientes parámetros óptimos de fermentación: Temperatura, 30°C; agitación, 150 r.p.m.; pH 6.5, y condiciones anaerobias.  
15
4. Método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso, según reivindicación 1 y 2, **caracterizado** porque la productividad del sistema viene determinada por el flujo de adición de medio de cultivo.  
20
5. Método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso, según reivindicación 1 y 2, **caracterizado** por la utilización del medio de suspensión de las células concentradas constituido por leche descremada reconstituida al 11% (p/v) y suplementada con sacarosa al 8% (v/v) como agente crioprotector, que incrementa la tasa de supervivencia tras el proceso de liofilización.  
25
6. Método de producción por cultivo continuo de un fermento láctico mixto de adición directa para elaboración de queso, según reivindicación 1 y 2, **caracterizado** porque la utilización de un medio de cultivo de bajo coste cuya composición es: lactosa, 0.5%; extracto de levadura, 1%;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.005%;  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0.25%;  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ , 0.2%, permite incrementar la relación productividad / coste del sistema.  
30
7. Método de producción según reivindicación 1 y 2 **caracterizado** por la utilización de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 947 (CECT 5180), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 (CECT 5181) y *Leuconostoc citreum* IPLA 616 (CECT 5182).  
35

40

45

50

55

60

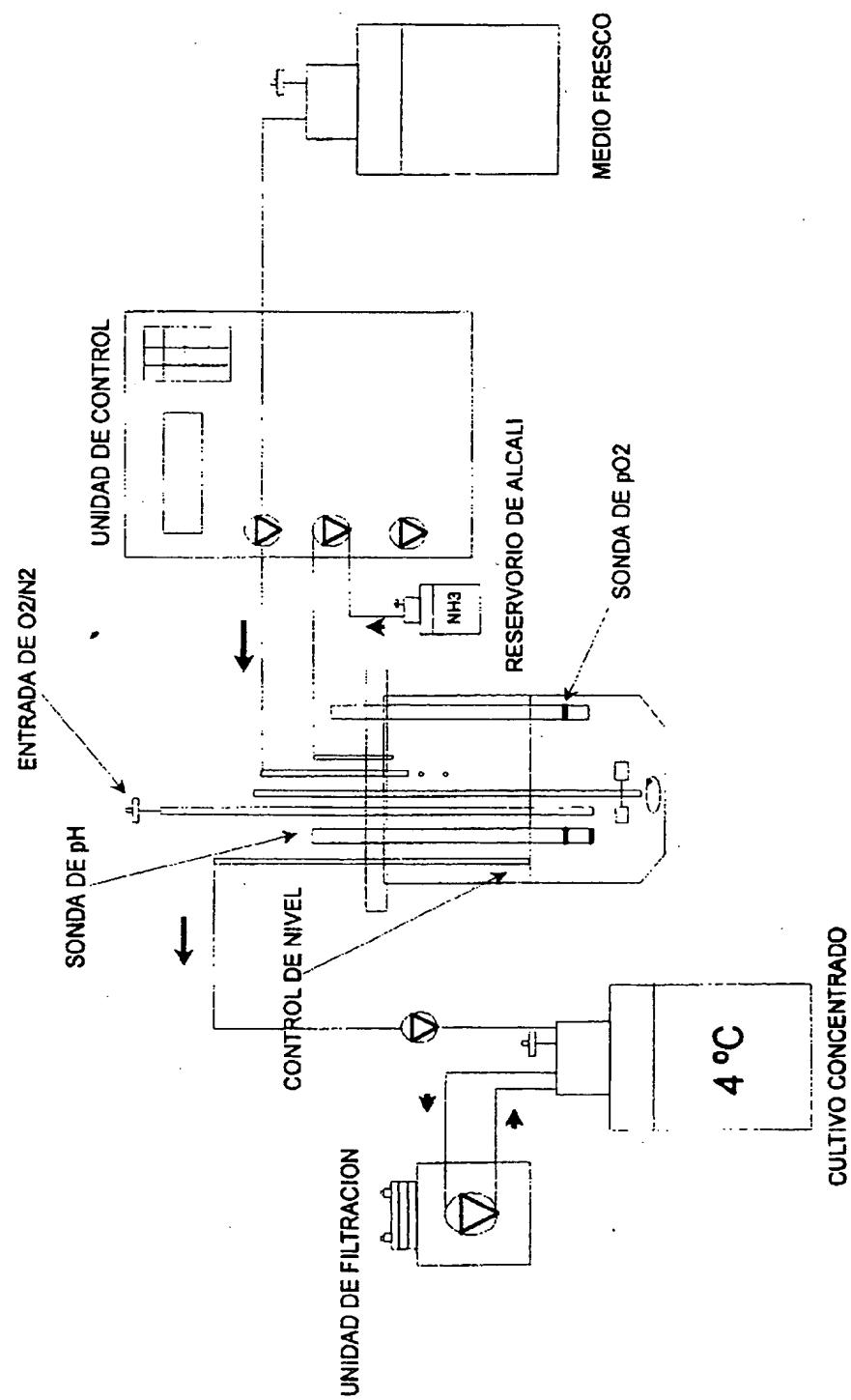


Figura 1

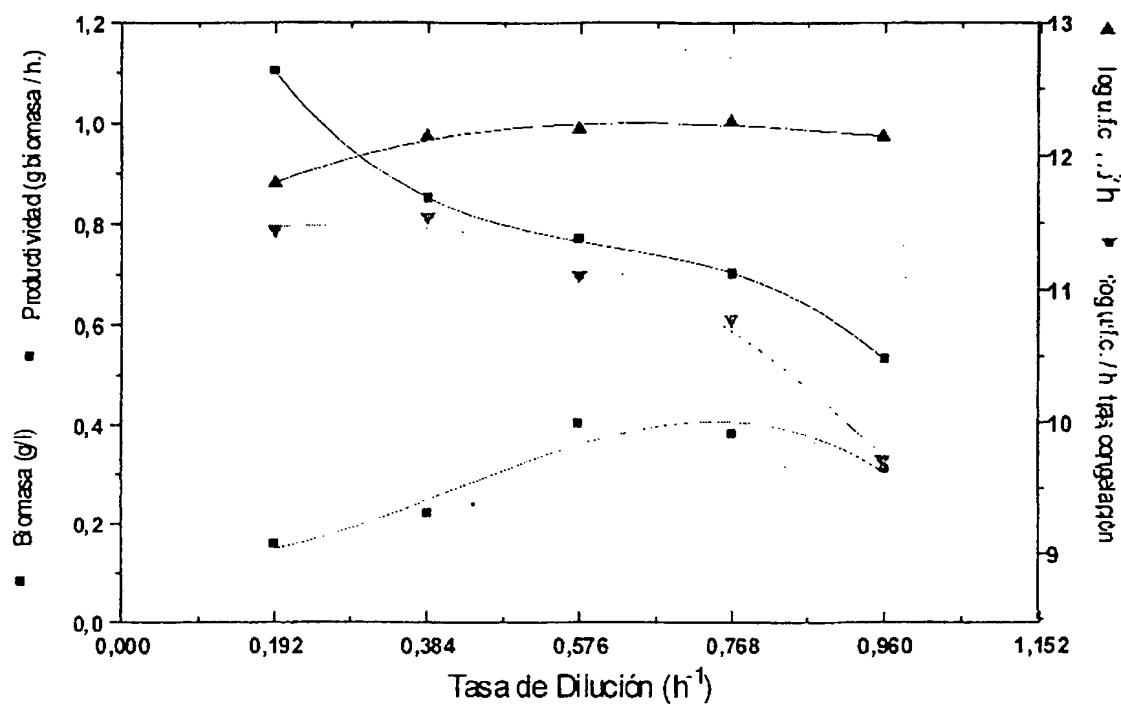


Figura 2



⑪ ES 2 158 800

⑯ N.º solicitud: 009901980

⑰ Fecha de presentación de la solicitud: 03.09.1999

⑲ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.: C12N 1/00. A23C 19/00

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 377762 A1 (KUBOTA TEKKO KABUSHIKI KAISHA) 18.07.1990. columna 1, líneas 1-5; columna 2, líneas 46-55; columna 3. líneas 1-10; columna 4, líneas 22-32.	1
A	LAMBOLEY, L. et al. Continuous Mixed Strain Mesophilic Lactic Starter Production in Supplemented Whey Permeate Medium Using Immobilized Cell Technology. Biotechnology and Bioengineering. 1997. Vol. 56, nº 5, páginas 502-516.	
A	GILLILAND, S.E. Preparation and Storage of Concentrated Cultures of Lactic Streptococci. Journal of Dairy Science, 1976, Vol. 60, nº 5. páginas 805-808.	
A	LLOYD, G.T. et al. Some properties of frozen concentrated starters produced by continuous culture. Journal of Dairy Research. 1973, Vol. 40, páginas 157-167.	

#### Categoría de los documentos citados

✓ De particular relevancia

○ Referido a divulgación no escrita

✗ De particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

□ Publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

✗ De interés general de la técnica

□ Documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.09.2001

Examinador

J. López Nieto

Página

1/1